抗树鼩 CD3ε 单克隆抗体的制备及生物学特性鉴定

徐婧雯 张雪梅 吴忠香 朱文兵 蒋曦 巩蔚 严丽蔚 宋杰 李慧 董少忠[*]

（中国医学科学院 北京协和医学院 医学生物学研究所 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室 中国医学科学院医学生物学研究所实验树鼩标准化与应用研究省创新团队 昆明 650118）

摘要：**目的** 制备鼠抗树鼩 CD3ε 单克隆抗体，并对其生物学特性进行鉴定。**方法** 以 GST-CD3ε 蛋白为免疫原免疫 BALB/c 小鼠，利用杂交瘤技术融合免疫后的 BALB/c 小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤 SP2/0 细胞，通过间接 ELISA 方法检测，筛选出多株能分泌抗树鼩 CD3ε 的杂交瘤细胞株，经过 3 次亚克隆筛选后，制备小鼠腹水单克隆抗体，并纯化得到鼠抗树鼩 CD3ε 单克隆抗体，通过腹水单克隆抗体效价测定、单克隆抗体亲和力测定、单克隆抗体抗原表位分析、 Western blot 和 FACS 分析其生物学特性。**结果** 筛选到 5 株能稳定分泌抗树鼩 CD3ε 单克隆抗体的杂交瘤细胞株，命名为 78I、87I、92D1、75II 和 35C8，腹水单克隆抗体效价分别为 1:10^6、1:10^6、1:10^4、1:10^6、1:10^3，亲和力解离常数（Kd）分别为 1.8×10^{-5}、2.9×10^{-5}、4.9×10^{-5}、7.3×10^{-5}、3.6×10^{-5}。5 株单克隆抗体抗原表位分析显示 78I、87I 和 75II 识别同一抗原表位，而 92D1 和 35C8 识别另一抗原表位。经 Western blot 检测，HRP 标记后的 92D1 能识别 GST-CD3ε 蛋白和树鼩 PBMC，并对大鼠、小鼠和猴的 PBMC 有抗体交叉反应。经 FACS 检测，PE-Cy5.5 标记后的 92D1 能特异性识别树鼩 PBMC。**结论** 成功制备出鼠抗树鼩 CD3ε 的单克隆抗体，为进一步应用于树鼩免疫检测奠定基础。

关键词：树鼩；CD3ε；单克隆抗体

Preparation and identification of monoclonal antibodies against tree shrews CD3ε

XU Jing-wen, ZHANG Xue-mei, WU Zhong-xiang, ZHU Wen-bing, JIANG Xi, GONG Wei, YAN Li-wei, SONG Jie, LI Hui, DONG Shao-zhong*

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College; Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Disease, Yunnan Innovation Team of Standardization and Application Research in Tree Shrew, Kunming 650118, China)

[*]基金资助：云南省科技人才和平台计划项目（2017HC019）；云南省科技计划项目（2016BC004）
通讯作者：董少忠 Email: dsz@imbcams.com.cn

Abstract：Objective: To develop monoclonal antibodies (mAbs) against tree shrews CD3ε, and identify their biological characteristics. **Method:** BALB/c mice were immunized with GST- CD3ε protein as an immunogen. Immunized mice spleen cells were fused with SP2/0 cells with the hybridoma technique. GST- CD3ε proteins and GST proteins were used as coating antigens to establish the indirect ELISA. After screening and three rounds of cloning process, the strain of hybridomas secreting anti- CD3ε mAbs were obtained. More anti- CD3ε mAbs were prepared by mice ascites, which were purified by Protein A resin. Then anti- CD3ε mAbs were identified with indirect ELISA , superposable ELISA, antibody titer evaluation, Western blot and FACS. **Result:** Five hybridomas were obtained , and named 78I, 87I, 92D1, 75II and 35C8. The titer of five ascites were $1:10^6$, $1:10^6$, $1:10^4$, $1:10^6$ and $1:10^3$. The dissociation constant (Kd) of these ascites were 1.8×10^{-5}, 2.9×10^{-5}, 4.9×10^{-5}, 7.3×10^{-5} and 3.6×10^{-5}. Monoclonal antibody epitope analysis revealed that 78I, 87I, and 75II recognized the same antigenic epitope, whereas 92D1 and 35C8 recognized another antigenic epitope of GST- CD3ε. Western blot analysis showed that HRP-labeled 92D1 recognized GST-CD3ε and tree shrews' PBMC, and had an antibody cross-reactivity with PBMC from rats, mice and monkeys. After FACS detection, 92D1 labeled with PE-Cy5.5 can specifically identify the PBMC of tree shrews. **Conclusion:** Murine anti-tree shrews' CD3ε mAbs were successfully prepared, which laid the foundation for the further application in immune detection of tree shrews.

Key words: Tree shrews; CD3ε; monoclonal antibodies

树鼩（tree shrews, *Tupaia belangeri*）是哺乳纲攀鼩目树鼩科小型动物，是灵长类的近亲。树鼩用作实验动物已有 30 多年历史，有体型小，经济易得，易驯养，饲养管理成本低等优势，常用于替代或减少一些非人灵长类动物的使用[1]。多种人类病毒在树鼩上的研究显示，树鼩对多种常见人类病毒易感，如乙型肝炎病毒[2]、丙型肝炎病毒[3]、肠道病毒 EV71[4]、轮状病毒[5]、流感病毒[6]等等。除此之外，树鼩在其他多种疾病研究中，如肝癌[7]、乳腺癌[8]、糖尿病[9]、老年痴呆症[10]等研究中也有广泛的应用，是有很好的应用前景实验动物。

哺乳动物的 CD3 分子表达于成熟 T 淋巴细胞表面，是 T 淋巴细胞受体(TCR)复合体的重要组成部分，也是 T 细胞群的重要表面标志。在 T 细胞抗原识别和免疫应答产生过程中，CD3 分子具有极其重要的作用，许多疾病的研究都以 CD3 分子作为检测的重要指标。CD3 分子由 γ、

δ、 ε、 ζ、 η 等 5 种多肽链组成， ε 链主要介导抗原或超抗原的活化信号[11]。

目前对树鼩的 CD3 分子研究还较少[12]，也没有相应的商品化多克隆抗体或单克隆抗体可用于检测树鼩的 CD3 分子，导致在很多研究中不能直观的检测到树鼩体内相关淋巴细胞变化的情况，阻碍了树鼩作为实验动物的应用和发展。为此，我们针对树鼩 CD3 分子制备了单克隆抗体，推进了树鼩作为实验动物的研究和应用。由于目前广泛应用的人和小鼠 CD3 单克隆抗体多为针对 CD3 分子的 ε 链制备抗体，因此本研究也以树鼩 CD3 分子的 ε 链进行单克隆抗体的制备。

1 材料与方法

1.1 材料

表达载体 pGEX-5X-1 由本实验室保存。DH5α 和 BL21 感受态细胞由本实验室制备。淋巴细胞分离液 Lymphoprep 购自 AXIS-SHIELD。 TRNzolA+、质粒小提试剂盒和 DNA 纯化回收试剂盒购自天根生化。Prime Script 1st Strand cDNA Synthesis Kit、PrimeSTAR Max DNA Polymerase、T4 DNA Ligase 购自 TaKaRa。*EcoR* I 和 *Xho* I 购自 NEB。Glutathione Sepharose 4 Fast Flow 购自 GE。Protein A resin 购自 TRANS。小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 由本实验室保存。6-8 周龄 BALB/c 小鼠来源于中国医学科学院医学生物学研究所[SYXK（滇）K2013-0008]，树鼩来源于中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心[SCXK（滇）K2013-0001]。完全和不完全弗氏佐剂、次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶核苷（HAT）、次黄嘌呤-胸腺嘧啶核苷（HT）、聚乙二醇(PEG4000)、液体石蜡和 Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents 购自 Sigma。1640 培养基和胎牛血清购自 BI。HRP 标记山羊抗小鼠二抗购自 Thermo。TMB 显色液购自 solarbio。超滤管购自 Millipore。细胞培养瓶购自 NEST。细胞培养板和 ELISA 酶标反应板购自 Corning。HRP 标记试剂盒购自 Proteintech，PE-Cy5.5 标记试剂盒购自 Innova Biosciences。BSA 购自 VWR。其他试剂为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 树鼩 CD3ε 原核表达载体构建及蛋白纯化

根据 GenBank 上发表的树鼩脾脏 CD3ε mRNA 全长序列（HM007192.1），利用 SignalP 4.1 预测分析 CD3ε 信号肽，并根据表达载体 pGEX-5X-1 的多克隆位点，设计包含 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点的引物用以扩增不含信号肽的树鼩脾脏 CD3ε 序列（表 1）。引物由华大基因合成。

树鼩尾静脉采血后用淋巴细胞分离液 Lymphoprep 分离 PBMC，TRNzolA+提取总 RNA，Prime

Script 1st Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录得到 cDNA 作为模板， PCR 扩增得到不含信号肽的 CD3ε 基因，再经胶回收、双酶切、连接等步骤，将 CD3ε 构建到 pGEX-5X-1 原核表达载体上，经双酶切鉴定并送华大基因进行测序，测序正确的 pGEX-5X-CD3ε 转化 BL21 感受态细胞，菌液 OD600 达到 0.4~0.6 A 时加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L， 25 ℃培养 4 h 后离心收集菌体，超声波破碎菌体并经 SDS-PAGE 分析蛋白表达情况。将含有目的蛋白的表达超声上清经 Glutathione Sepharose 4 Fast Flow 亲和层析柱纯化，超滤管进行换液及浓缩，得到纯化的 GST-CD3ε 蛋白。

空载体 pGEX-5X-1 转化 BL21 感受态细胞后按同样方法进行表达和纯化，得到纯化的 GST 标签蛋白。

表 1 重组蛋白原核表达载体构建所用引物序列

Table 1 Primer sequences for the construction of expression vectors of the recombinant proteins

Primer name	Primer sequence（5’-3’）
CD3ε-F	CCGGAATTCGAGGACGATAACGACAAAACT
CD3ε-R	CCGCTCGAGTCAGATGCCTCTCTGATTCA

1.2.2 树鼩 CD3ε 杂交瘤细胞株的制备和筛选

BALB/c 小鼠以 3 周间隔进行四次免疫，程序为：首次免疫，弗氏完全佐剂与等量 1 mg/mL GST-CD3ε 蛋白充分混合乳化后，背部皮下多点注射，100 μL/只。第二次免疫和第三次免疫，佐剂换为弗氏不完全佐剂，方法和计量同首次免疫。第四次免疫采用腹腔注射未加佐剂的 GST-CD3ε 蛋白，注射量同前三次免疫。

细胞融合前 2 天，取健康 BALB/c 小鼠腹腔巨噬细胞制备饲养层细胞。第四次免疫 3 天后，取免疫小鼠的脾脏细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 按 10:1 比例混合，45% PEG4000 进行融合，融合后细胞按 100 μL/孔的量加入已铺好饲养层细胞的 96 孔细胞培养板中用 HAT 的完全培养基培养。每 4 天更换一半量的 HAT 的完全培养基，并观察细胞生长状况。

融合后 12-14 天，用 GST-CD3ε 蛋白包被酶标反应板，取融合细胞培养上清进行间接 ELISA 进行初次筛选，SP2/0 培养上清为阴性对照，二抗为 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG（1:6000），显色终止后，酶标仪检测 450 nm 吸光度值（A450 值），以高于阴性对照 A450 值 2.1 倍以上的孔为阳性孔，筛选 A450 值较高的阳性杂交瘤细胞孔，连续进行 3 次亚克隆培养。

在亚克隆培养过程中，用 GST-CD3ε 蛋白和 GST 蛋白分别包被酶标板，封闭后取杂交瘤细培养上清同时进行间接 ELISA，根据两块酶标板 A450 值读数，筛选去除仅针对 GST 蛋白包被酶标板 A450 值高的杂交瘤细胞株，保留针对 GST-CD3ε 蛋白包被酶标板 A450 值高，且同时针对 GST 蛋白包被酶标板 A450 值低的杂交瘤细胞株，这些杂交瘤细胞株进行进一步的亚克隆和扩增培养。

1.2.3 树鼩 CD3ε 单克隆抗体腹水制备、效价测定及纯化

BALB/c 小鼠腹腔注射无菌液体石蜡进行致敏，致敏 7 天后腹腔注射 1×10^6 个杂交瘤细胞。接种后观察小鼠腹部隆起状态，约 7-10 天处死小鼠，吸出全部腹水进行离心，离心后上清即为腹水单克隆抗体。

腹水单克隆抗体通过间接 ELISA 测定其抗体效价，用 1 μg/mL GST-CD3ε 包被酶标反应板，封闭后取腹水单克隆抗体从原倍开始进行梯度稀释上样，以 SP2/0 培养上清为阴性对照，二抗为 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG（1:6000），显色终止后，酶标仪检测 450 nm 吸光度值（A450 值），以 A450 值高于阴性对照 A450 值 2.1 倍以上的孔判定为阳性孔。读数最低的阳性孔处，上样腹水单克隆抗体的稀释度，即为该腹水单克隆抗体的效价。

腹水单克隆抗体过 Protein A 亲和层析柱进行纯化，纯化产物经 SDS-PAGE 分析鉴定后，用超滤管对纯化后的单克隆抗体进行换液及浓缩。

1.2.4 树鼩 CD3ε 单克隆抗体亲和力测定

亲和力鉴定利用间接 ELISA 进行测定，按 1 μg/mL GST-CD3ε 包被酶标反应板，封闭后将腹水单克隆抗体进行倍比稀释上样，二抗为 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG（1:6000），显色终止后，酶标仪检测 450 nm 吸光度值（A450 值）。当连续几个稀释度的 A450 值不再增大时，视为抗原抗体 100%结合，以抗体浓度（mol/L）为横坐标，A450 值为纵坐标，做散点图，生成对数趋势线和公式。将 A450 值最大值的一半带入公式，求出此时抗体浓度即为单克隆抗体的亲和力解离常数（Kd）[13]。

1.2.5 树鼩 CD3ε 单克隆抗体的抗原表位分析

利用相加 ELISA 试验分析 5 株单克隆抗体所识别的抗原表位，按 1 μg/mL GST-CD3ε 包被酶标反应板，封闭后分两组进行上样，腹水单克隆抗体按 1：50 进行稀释，一组为每孔只加

一种单克隆抗体，另一组将单克隆抗体两两组合，每孔中等比加入混合单克隆抗体，二抗为HRP 标记山羊抗小鼠 IgG（1:6000），显色终止后，酶标仪检测 450 nm 吸光度值（A450 值）。结果以相加指数（AI）大于或小于 50%判定。按照公式

$$AI = \left(\frac{2A_{1+2}}{A_1 + A_2} - 1\right) \times 100\%$$

计算两种单克隆抗体叠加后的重叠率。其中 A1 表示第一种单克隆抗体的 A450 值，A2 表示第二种单克隆抗体的 A450 值，A_{1+2}表示两种单克隆抗体混合相加后的 A450 值。若两种单克隆抗体识别同一抗原表位，那么 AI 值应小于 50%，若两种单克隆抗体识别不同抗原表位，那么 AI 值应大于 50%[14, 15]。

1.2.6 树鼩 CD3ε单克隆抗体的标记

分别根据 Proteintech 公司 HRP 标记试剂盒和 Innova Biosciences 公司 PE-Cy5.5 标记试剂盒说明书，对纯化后的 CD3ε单克隆抗体进行标记，得到带 HRP 标记和 PE-Cy5.5 标记的 CD3ε单克隆抗体用于 western blot 和 FACS 检测。

1.2.7 树鼩 CD3ε单克隆抗体特异性鉴定

1.2.7.1 Western blot

取 GST-CD3ε、GST、及经 RIPA 处理后提取的树鼩 PBMC 总蛋白、大鼠 PBMC 总蛋白、小鼠 PBMC 总蛋白和猴 PBMC 总蛋白进行 15% SDS-PAGE，100 mA 转膜 45 min，转膜结束后加入丽春红染色，确定目的条带所在位置，剪膜后用水洗净，5%脱脂奶粉封闭 1 h，洗膜后加入 HRP 标记 CD3ε单克隆抗体（1:1000），室温孵育 1 h，洗膜后 ECL 化学发光检测。同时检测内参β-actin，5%脱脂奶粉封闭 1 h，洗膜后加入抗小鼠β-actin 单克隆抗体（1:2000），室温孵育 1 h，洗膜后二抗为 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG（1:10000），室温孵育 45 min，洗膜后 ECL 化学发光检测。

1.2.7.2 FACS

树鼩经尾静脉采血，用淋巴细胞分离液 Lymphoprep 分离树鼩外周血中的 PBMC，PBMC 用 PBS 洗涤后细胞计数，调整细胞浓度为 1×10^7 个/mL。将 PBMC 分为 100μL 每份，取 2 份，每份约 1×10^6 个细胞。取一份细胞加入 5μl PE-Cy5.5 标记的 CD3ε单克隆抗体；另一份细胞不

加抗体，作为空白对照。室温下避光反应 2 小时后每份加入 1mL PBS，洗涤细胞一次，离心弃上清，每份细胞加入 300 μL PBS 重悬细胞，即可进流式细胞仪检测分析。

2 结果

2.1 树鼩 CD3ε 基因片段的获得及原核表达载体构建

树鼩脾脏 CD3ε（HM007192.1）序列全长为 582 bp， SignalP 4.1 预测分析其信号肽切割位点在第 21 位和第 22 位氨基酸之间，去除了预测信号肽的树鼩 CD3ε 片段长度为 519bp。经琼脂糖凝胶电泳分析，PCR 扩增得到约 519bp 的特异性条带，与预期 CD3ε 片段大小相符（图 1 a），成功扩增得到 CD3ε 基因。构建的重组质粒 pGEX-5X-CD3ε 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后，得到约 4900bp 和 519bp 的两条特异性条带，与 pGEX-5X-1 载体和 CD3ε 片段大小相符（图 1 b）。双酶切鉴定正确后重组质粒 pGEX-5X-CD3ε 送华大基因测序，测序结果比对后表明重组载体构建正确，插入的目的基因 CD3ε 序列正确（测序结果略）

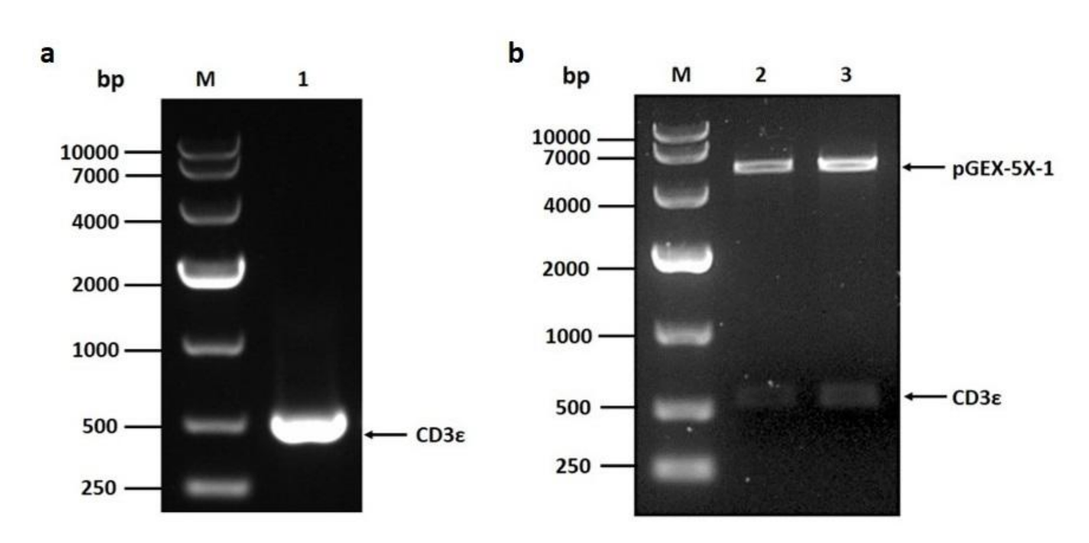


图 1. 基因克隆以及重组质粒双酶切鉴定

Fig. 1 Cloned gene and double enzyme digestion analysis of recombinant plasmid

(a) Cloned CD3ε gene. M: DNA marker DL10000; 1: The PCR products of CD3ε.

(b) Double enzyme digestion analysis of recombinant plasmid pGEX-5X-CD3ε. M: DNA marker DL10000; 2 & 3: pGEX-5X-CD3ε digested with *EcoR* I and *Xho* I.

2.2 树鼩 CD3ε 重组蛋白表达及纯化

经 EditSeq 软件分析去除信号肽的树鼩 CD3ε 蛋白大小约 19 kDa，pGEX-5X-1 的标签蛋白 GST 大小约 26 kDa，预测 pGEX-5X-CD3ε 诱导表达的 GST-CD3ε 蛋白大小约 46 kDa。

pGEX-5X-CD3ε 诱导表达产物经 SDS-PAGE 分析，显示在 46 kDa 附近有特异性条带出现，与预期的 GST-CD3ε 蛋白大小相符，且蛋白以可溶形式存在于表达超声上清中（图 2 a)，pGEX-5X-1 诱导表达的标签蛋白 GST 经 SDS-PAGE 分析，显示以可溶形式存在于表达产物超声上清中，大小约为 26 kDa（图 2 b）。pGEX-5X-CD3ε 和 pGEX-5X-1 的表达产物超声上清分别经 Glutathione Sepharose 4 Fast Flow 亲和层析柱纯化后，进行超滤和浓缩，经 SDS-PAGE 分析，显示得到纯度较好的 GST-CD3ε 蛋白和 GST 蛋白（图 2 c)。

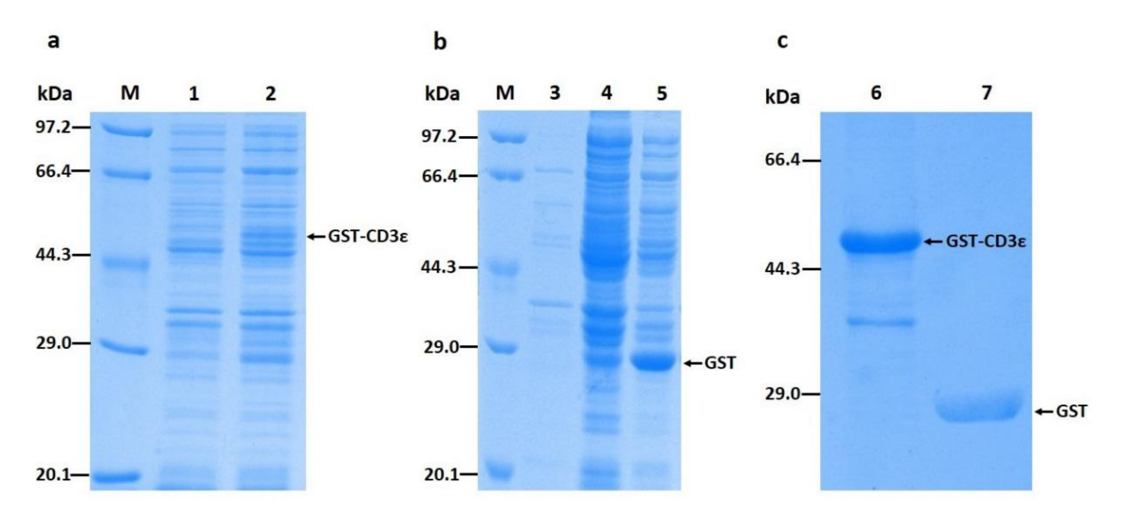


图 2. 重组蛋白 GST-CD3ε 和标签蛋白 GST 的表达及纯化

Fig. 2 Preparation of recombinant GST-CD3ε proteins and GST tagging proteins

(a) Induction of recombinant GST-CD3ε proteins. M: protein marker; 1: total proteins of pGEX-5X-CD3ε before induction; 2: ultrasound supernatant proteins of pGEX-5X-CD3ε after induction.

(b) Induction of GST tagging proteins. M: protein marker; 3: total proteins of pGEX-5X-1 before induction; 4: total proteins of pGEX-5X-1 after induction; 5: ultrasound supernatant proteins of pGEX-5X-1 after induction.

(c) Purification of recombinant GST-CD3ε proteins and GST tagging proteins. 6: purified GST-CD3ε proteins; 7: purified GST proteins.

2.3 抗树鼩 CD3ε 杂交瘤细胞株的建立

小鼠 4 次免疫后脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 利用细胞融合技术，并经间接 ELISA 筛选后得到杂交瘤细胞，杂交瘤细胞经过 3 次细胞亚克隆培养，及 GST-CD3ε 和 GST 的间接 ELISA 双筛，制备出能分泌抗树鼩 CD3ε 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 5 株，分别命名为 78I、87I、92D1、75II 和 35C8。

2.4 树鼩 CD3ε 单克隆抗体腹水制备、效价测定及纯化

5 株杂交瘤细胞 78I、87I、92D1、75II 和 35C8 制备腹水单克隆抗体后，间接 ELISA 测定腹水单克隆抗体效价分别为 $1:10^6$、$1:10^6$、$1:10^4$、$1:10^6$、$1:10^3$。5 份腹水单克隆抗体经 Protein A 亲和层析柱纯化后，进行 SDS-PAGE 电泳确认腹水单克隆抗体的纯化效果，结果显示 5 份单克隆抗体样品均在约 26 kDa 和 56 kDa 出现了蛋白条带，与鼠源单克隆抗体轻链和重链的理论值基本一致，表明得到了较高纯度的单克隆抗体（图 3）。

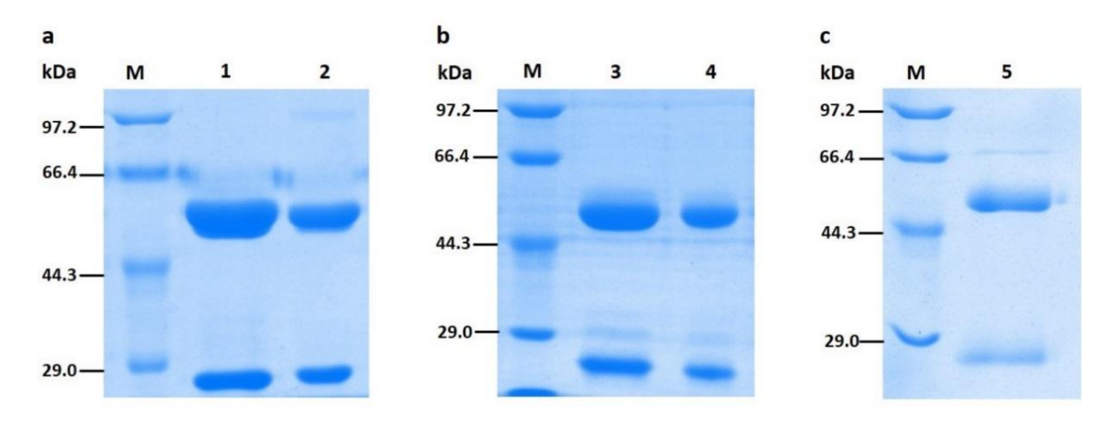


图 3. CD3ε 腹水单克隆抗体纯化

Fig. 3 Purification of anti-CD3ε ascites mAbs

(a) Purification of 78I and 87I ascites mAbs. M: protein marker; 1: purified 78I mAbs; 2: purified 87I mAbs.

(b) Purification of 75II and 92D1 ascites mAbs. M: protein marker; 3: purified 75II mAbs; 4: purified 92D1 mAbs.

(c) Purification of 35C8 ascites mAbs. M: protein marker; 5: purified 35C8 mAbs.

2.5 树鼩 CD3ε 单克隆抗体亲和力测定

利用间接 ELISA 方法测定 5 株单克隆抗体的亲和力，分别以抗体浓度（mol/L）为横坐标，A450 值为纵坐标，做散点图，生成对数趋势线和公式，将 5 株单克隆抗体 A450 值最大值的一半带入公式，求出此时抗体浓度即为单克隆抗体的亲和力解离常数（Kd），结果表明 78I、87I、92D1、75II 和 35C8 的亲和力解离常数分别为 1.8×10^{-5}、2.9×10^{-5}、4.9×10^{-5}、7.3×10^{-5}、3.6×10^{-5}。（图 4）

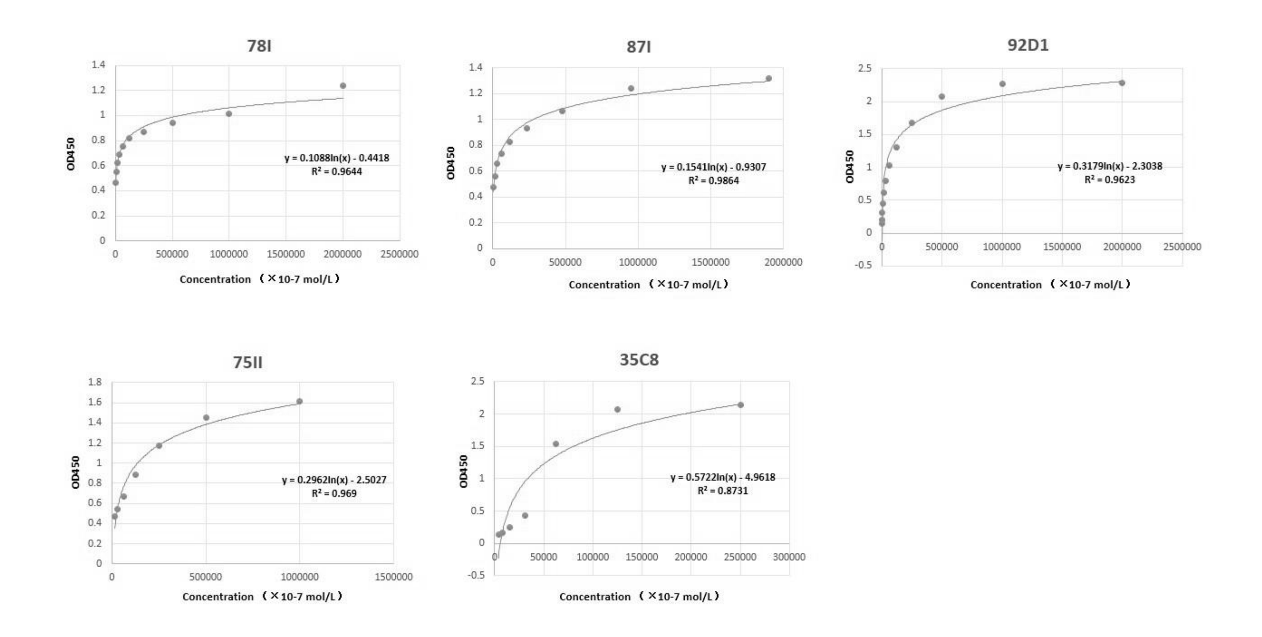


图 4. CD3ε单克隆抗体亲和力测定

Fig. 4 Affinity test of anti-CD3ε mAbs

2.6 树鼩 CD3ε单克隆抗体的抗原表位分析

5 株单克隆抗体进行相加 ELISA 试验分析抗原表位，根据各株抗体测定的 A450，及相加抗体测定的 A450，通过公式计算 AI，AI 值小于 50%表明两种单克隆抗体识别同一抗原表位， AI 值大于 50%表明两种单克隆抗体识别不同抗原表位，结果显示 78I、87I 和 75II 识别同一抗原表位，而 92D1 和 35C8 识别另一抗原表位。

表 2 CD3ε单克隆抗体相加 ELISA 结果

Table 2 The result of superposable ELISA test of anti-CD3ε mAbs

mAb	78I		87I		92D1		75II		35C8	
	OD450	AI（%）	OD450	AI（%）	OD450	AI（%）	OD450	AI（%）	OD450	AI（%）
78I	0.92	/								
87I	0.92	0%	0.92	/						
92D1	2.40	154%	1.51	60%	0.97	/				
75II	1.13	40%	1.00	24%	1.92	131%	0.69	/		
35C8	2.40	167%	1.73	92%	0.96	4%	1.99	154%	0.88	/

2.7 树鼩 CD3ε 单克隆抗体特异性鉴定

2.7.1 Western-blot

利用 Western-blot 鉴定 CD3ε 单克隆抗体对免疫原 GST-CD3ε 蛋白和载体标签蛋白 GST 的识别情况，结果表明 HRP 标记的单克隆抗体 92D1 能特异性识别 GST-CD3ε 蛋白，在约 46 kDa 附近有特异性条带出现，与 GST-CD3ε 蛋白大小相符，但 HRP 标记的单克隆抗体 92D1 不识别 GST 蛋白，没有特异性条带出现（图 5 a），这也表明经 GST-CD3ε 和 GST 的间接 ELISA 双筛制备出的 CD3ε 单克隆抗体排除了载体标签蛋白 GST 的干扰，对目的蛋白的特异性识别能力较好。

制备的树鼩 CD3ε 单克隆抗体除了要能识别外源表达的 CD3ε 蛋白，还需要检测其是否能识别树鼩体内天然的 CD3ε 蛋白，将树鼩 PBMC 总蛋白 20μg 、10μg 和 5μg 经 Western-blot 检测，结果显示 HRP 标记的 92D1 单克隆抗体能特异性识别树鼩 PBMC，有大小约 19 kDa 的特异性条带出现，与预期的树鼩 CD3ε 蛋白大小相符（图 5 b），表明 92D1 单克隆抗体不但可以识别外源表达的树鼩 CD3ε 重组蛋白（图 5 a），也可以识别天然的树鼩 CD3ε 蛋白（图 5 b）。

树鼩、大鼠、小鼠和猴的 PBMC 总蛋白各 10μg 进行 Western-blot 检测，结果显示 HRP 标记的 92D1 单克隆抗体能识别树鼩、大鼠、小鼠和猴的 PBMC，条带大小均在 19 kDa 附近（图 5 c），表明该抗体存在交叉反应。

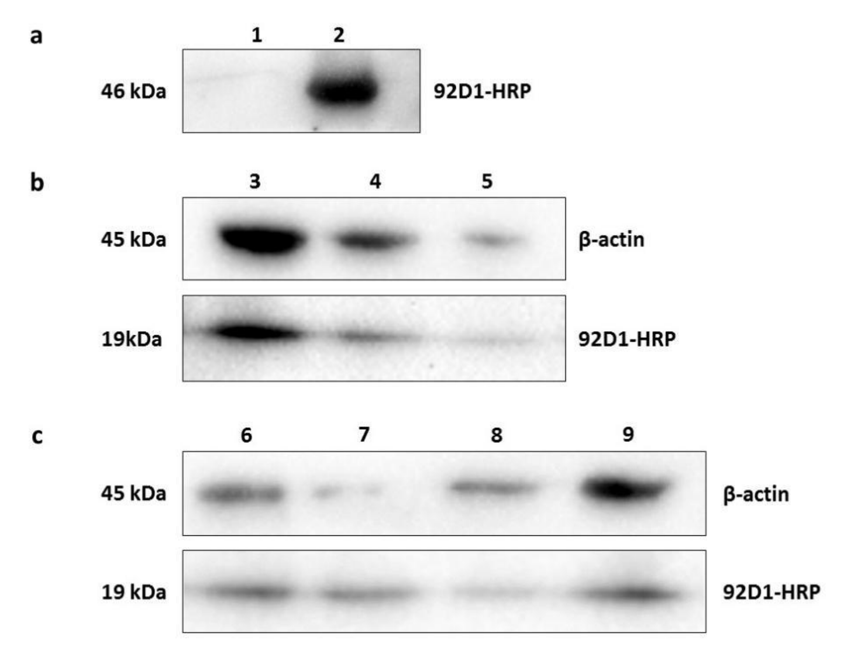


图 5. CD3ε 单克隆抗体 Western-blot 鉴定

Fig.5 Identification of specificity of anti-CD3ε mAbs by Western-blot

(a) Recognition of recombinant GST-CD3ε proteins and GST tagging proteins by 92D1-HRP 1: purified GST; 2: purified GST-CD3ε.

(b) Recognition of tree shrews' PBMC total proteins by 92D1-HRP 3: tree shrews' PBMC total proteins 20 μg;

4: tree shrews' PBMC total proteins 10 μg; 5: tree shrews' PBMC total proteins 5 μg.

(c) Antibody cross-reaction of 92D1-HRP 6: tree shrews' PBMC total proteins 10 μg; 7: rats' PBMC total proteins 10 μg; 8: mice's PBMC total proteins 10 μg; 9: monkeys' PBMC total proteins 10 μg.

2.7.2 FACS

流式细胞检测结果显示经 PE-Cy5.5 标记的 92D1 单克隆抗体，可以检测到树鼩 PBMC 中 CD3 阳性淋巴细胞，在数量为 1×10^{6} 个的树鼩 PBMC 中，CD3 阳性淋巴细胞的比例约为 89.5%（图 6 b），表明 92D1 单克隆抗体可以识别树鼩体内 CD3 阳性的淋巴细胞。

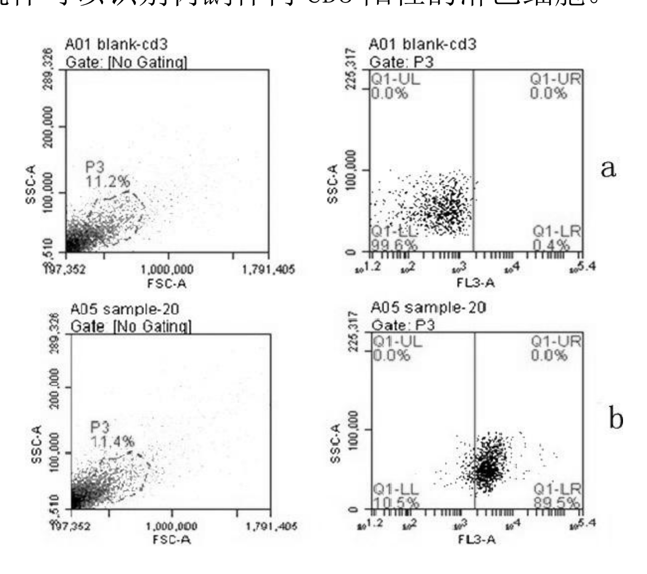


图 6. 流式细胞术检测 CD3ε 单克隆抗体对树鼩 PBMC 的识别

Fig.6 Flow cytometry analysis the PBMC of tree shrews using the anti-CD3ε mAb 92D1

(a) Blank control: tree shrews' PBMC with no antibody.

(b) tree shrews' PBMC with PE-Cy5.5-92D1.

3 讨论

树鼩 CD3ε 完整的编码序列已有文献报道[12]，但树鼩 CD3ε 蛋白的体外表达，及其单克隆抗体的制备却尚未有文献报道。本研究采用原核表达系统首次在体外表达了树鼩 CD3ε 融合蛋白 GST-CD3ε，并用其作为免疫原制备了树鼩 CD3ε 单克隆抗体。考虑到融合蛋白在小鼠免疫过程中，其标签蛋白 GST 部分也具有免疫原性，会导致小鼠产生针对 GST 的抗体，所以在杂交瘤细胞的筛选过程中，间接 ELISA 利用 GST-CD3ε 蛋白和 GST 蛋白对杂交瘤细胞分泌的抗体进行了双重筛选，有效的筛选去除了仅分泌针对标签蛋白 GST 抗体的杂交瘤细胞，保证了筛选到的杂交瘤细胞为分泌针对树鼩 CD3ε 蛋白的抗体。

树鼩 CD3ε 单克隆抗体 92D1 除了能特异性识别作为免疫原的 GST-CD3ε 蛋白，也能特异性识别树鼩 PBMC 中的 CD3ε 蛋白。另外经 Western blot 检测发现 92D1 存在抗体交叉反应，能识别大鼠、小鼠和猴 PBMC 中的 CD3ε 蛋白。通过 GenBank 查到大鼠（NP_001101610.1）、小鼠（NP_031674.1）和猴（NP_001270544）的 CD3ε 氨基酸序列，分析可知大鼠、小鼠和猴的 CD3ε 蛋白均与树鼩 CD3ε 蛋白大小相似，且氨基酸序列比对后发现大鼠、小鼠和猴的 CD3ε 与树鼩 CD3ε 相似性分别为 60%、63%和 64%。

在目前的很多关于树鼩感染病毒的研究中，由于缺乏检测树鼩细胞免疫的相关试剂[16]，大部分研究仅只能对树鼩感染的病毒进行检测[17]，而不能对感染病毒后的树鼩体内免疫细胞状况进行分析和评估，这限制了树鼩这种很有发展前景的实验动物的进一步应用及发展。本研究制备的树鼩 CD3ε 单克隆抗体 92D1 可用于分选和测定树鼩 PBMC 中的 $CD3^+$ T 细胞群，有助于进一步了解树鼩的细胞免疫状态及功能，为树鼩细胞免疫机理的研究，和推进树鼩这种实验动物的发展，奠定了一定的基础。

参考文献：

[1] FAN Y, HUANG Z Y, CAO C C, et al. Genome of the Chinese tree shrew. Nature Communications, 2013, 4(1426): 1-9.

[2] 方鹤, 金雄, 王冬冬, 等. 树鼩原代肝细胞培养及体内外感染 HBV 的研究进展.临床肝胆病杂志, 2015, 31（10）: 1740-1743.

FANG He, JIN Xiong, WANG Dongdong, et al. Research progress in culture and in vivo and in vitro HBV infection of primary hepatocytes of tree shrews. Journal of Clinical Hepatology, 2015, 31（10）: 1740-1743.

[3] ZHAO X, TANG Z Y, KLUMPP B, et al. Primary hepatocytes of Tupaia belangeri as a potential model for hepatitis C virus infection. Journal of Clinical Investigation, 2002, 109(2): 221-232

[4] 王文广, 黄晓燕, 徐娟,等. EV71 可感染幼龄中缅树鼩. 动物学研究, 2012, 33（1）: 7-13.

WANG Wen-Guang, HUANG Xiao-Yan, XU Juan, et al. Experimental studies on infant Tupaia belangeri chineses with EV71 infection. Zoological Research, 2012, 33（1）: 7-13.

[5] 万新邦, 庞其方, 丘福禧,等. 人轮状病毒实验感染成年树鼩的研究(摘要). 医学研究杂志, 1982, 3:6-7

Wan Xin-bang, Pang Qi-fang, Qiu Fu-xi, et al. Study on human rotavirus infection in adult tree shrew (Abstract). Journal of Medical Research, 1982, 3:6-7

[6] 朱宇同, 王维祥, 曾子安,等. 流感病毒感染成年树鼩的研究. 实验动物与比较医学, 1986,6（1）：20-23.

Zhu Yu-tong, Wang Wei-xiang, Zeng Zi-an, et al. Influenza virus infection in adult tree shrews. Laboratory Animal and Comparative Medicine, 1986, 6(1):20-23.

[7] RUIQI Y, JIANJIA S, DINGRUI H, et al. EXPERIMENTAL PRIMARY LIVER CANCER IN TREE SHREWS EXPOSED TO HUMAN HEPATITIS B VIRUS AND AFLATOXIN B_1. Chinese Journal of Cancer Research, 1989, 1(5):1-6.

[8] 葛广哲. 树鼩乳腺癌模型的建立, 昆明理工大学, 2015.

Ge Guangzhe. Generation of a Breast Carcinoma Tree Shrew Model, KUNMING UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2015.

[9] 冼苏, 黄松, 苏建家, 等. 链脲佐菌素诱导树鼩糖尿病动物模型研究. 广西医科大学学报, 2000, 17(6): 945-8.

Xian Su, Huang Song, Su jianjia, et al. A STUDY ON EXPERIMENTAL DIABETES ANIMAL MODELS IN TREE SHREWS INDUCED BY STREPTOZOTOCIN. JOURNAL OF GUANGXI MEDICAL UNIVERSITY, 2000, 17(6): 945-8.

[10]何保丽, 角建林, 李波,等. 天麻素对老年痴呆树鼩海马BDNF表达的影响. 昆明医科大学学报,2013,（9）: 29-30.

He Bao-li, Jiao Jian-lin, Li Bo, et al. Effects of Gastrodin on BDNF Expression in AD Tree Shrew. Journal of Kunming Medical University, 2013, （9）: 29-30.

[11]曹雪涛，何维. 医学免疫学.3版.北京: 人民卫生出版社, 2015.199-200

Cao Xue-tao, He Wei. Medical Immunology.3 version. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015. 199-200

[12]李乙江, 高跃东, 郭彦,等. 树鼩CD3ε全长编码序列的克隆及分子特征分析. 动物学研究, 2010, 31(5): 483-489.

LI Yi-Jiang, GAO Yue-Dong, GUO Yan, et al. Cloning of full-length coding sequence of tree shrew CD3ε and prediction of its molecular characteristics. Zoological Research, 2010, 31(5):483-489

[13]关晓宇, 徐志超, 王永强,等. 抗鸡白细胞介素4单克隆抗体的制备及鉴定. 生物工程学报, 2017, 33(1): 44-54.

Xiaoyu Guan, Zhichao Xu, Yongqiang Wang, et al. Generation and characterization of monoclonal antibodies against chicken interleukin 4. Chinese Journal of Biotechnology, 2017, 33(1):44-54

[14]刘苏燕, 董邦全, 李恩善. 分析不同单克隆抗体识别的表位特异性的三种ELISA方法比较. 上海免疫学杂志, 1991, 11(2): 108-112.

Liu Su-yan, Dong Bang-quan, Li En-shan. Analysis of the specificity of epitopes recognized by different monoclonal antibodies compared with the three ELISA methods, Shanghai Journal of Immunology, 1991,

11(2): 108-112.

[15]王海春. 重组牛γ-干扰素的表达、纯化、鉴定及其抗体制备; 中国农业科学院, 2012.

Wang Haichun. Expression and Identification of Recombinant Bovine IFN-γ and Preparation of its Monoclonal and Polyclonal Antibodies; Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012.

[16]李妍, 李丽红, 刘海, 等. 树鼩茄病镰刀菌性角膜炎房水中Th1/Th2炎性因子的变化. 眼科新进展, 2017, 37（9）: 824-827.

LI Yan，LI Li-Hong，LIU Hai，et al. Changes of Th1/Th2 inflammatory factors in the aqueous humor of tree shrews with fusarium solani keratitis. Recent Advances in Ophthalmology, 2017, 37（9）: 824-827.

[17]韩建保, 张高红, 段勇,等. 中缅树鼩自然感染六种病毒的血清流行病学. 动物学研究, 2011, 32（1）: 11-16.

HAN Jian-Bao, ZHANG Gao-Hong, DUAN Yong, et al. Sero-epidemiology of six viruses natural infection in Tupaia belangeri chinensis. Zoological Research, 2011, 32（1）: 11-16.